

# *Les greffes de gènes à but thérapeutique*

---

Pierre LEHN

## *Introduction*

Les récents progrès de la génétique moléculaire permettent à présent d'envisager une action au niveau du génome des cellules. Le concept de thérapie génique est donc un concept nouveau et révolutionnaire. La thérapie génique peut en effet se définir comme l'utilisation in vivo chez un patient du matériel génétique lui-même dans un but thérapeutique. C'est évidemment un sujet très prestigieux, voire même prétentieux. Cette prétention n'est pas la mienne, mais c'est celle de la Science dans l'espoir de permettre l'utilisation de ces nouveaux pouvoirs pour le bien de l'homme. Cependant, cette action sur le génome soulève de graves problèmes éthiques, si l'on considère les possibilités à long terme de manipulation de l'hérédité. La thérapie génique est ainsi à la source de fantasmes qui sont d'ailleurs pour beaucoup dans son caractère médiatique. Néanmoins, les possibilités actuelles de thérapie génique sont nettement plus limitées et plus réalistes. Alors que durant ma conférence j'ai décrit et abondamment

illustré l'état actuel des recherches scientifiques, je préfère au niveau de ce texte rappeler les questions éthiques soulevées à la fois par le processus scientifique engagé et par la mise en route des premiers essais cliniques de thérapie génique somatique aux Etats-Unis.

### *Avis du Comité National d'Ethique*

En raison des conséquences éventuelles à long terme des recherches de thérapie génique, le Comité Consultatif National d'Ethique a rendu un avis sur la thérapie génique en décembre 1990. Comme cet avis fixe le cadre des recherches de thérapie génique, il mérite d'être mentionné ici in extenso :

*«Les progrès des connaissances en génétique ouvrent la possibilité d'actions au niveau du génome de la cellule humaine visant à la correction d'une anomalie génétique responsable d'une maladie héréditaire ou à l'introduction d'un gène gouvernant la production d'une protéine conférant à cette cellule une action thérapeutique.*

*Le Comité Consultatif National d'Ethique émet un avis favorable aux recherches chez l'homme dans ce domaine, sous réserve du respect des conditions suivantes :*

*- il convient de limiter les possibilités de thérapie génique aux seules cellules somatiques et d'interdire formellement toute tentative de modification délibérée du génome des cellules germinales et toute thérapie génique comportant le risque d'une telle modification. Dans cet esprit, il convient d'interdire le transfert de gènes par des vecteurs viraux dans l'embryon humain du fait des risques d'atteinte des cellules germinales.*

*- dans le domaine des maladies héréditaires, les recherches de thérapie génique ne doivent être envisagées que pour des maladies résultant d'une anomalie concernant un seul gène (maladies monogéniques) et entraînant une pathologie particulièrement grave.*

*Si en application de la loi n°88-1138 du 30 décembre 1988 modifiée, des*

*protocoles de recherches sur le génome humain étaient soumis aux Comités consultatifs de protection des personnes dans la recherche biomédicale, il serait hautement souhaitable que ces Comités consultent le Comité Consultatif National d'Ethique avant de rendre leur avis».*

De façon schématique, le Comité National d'Ethique se montre favorable à la thérapie génique strictement somatique (soit pour des maladies héréditaires monogéniques soit pour des maladies acquises) et il souhaite être consulté pour tout essai clinique de thérapie génique. Par la suite, je vais évidemment être amené à discuter un certain nombre de questions prises en compte par le Comité dans son avis.

### ***Réflexions sur les recherches en thérapie génique.***

Quelques remarques très générales sont utiles pour mieux cerner l'ambiance dans laquelle se déroulent les recherches de thérapie génique. On rappelle que la thérapie génique peut actuellement se définir comme l'emploi chez un patient du transfert d'un gène bien précis à des fins thérapeutiques (monogénothérapie).

L'avancement des recherches dans le domaine du transfert de gènes est particulièrement bien décrit par le sous-titre «Getting there slowly» donné à une revue «thérapie génique» par l'anglais David Weatherall. En effet, des méthodes relativement efficaces de transfert de gènes utilisant des vecteurs viraux ont été progressivement mises au point ces dernières années chez la souris, alors que l'américain Martin Cline a été sanctionné, il y a 10 ans à peine, pour avoir tenté un essai de thérapie génique avec une technique de transfert, la transfection, trop inefficace. Une vision globale sur une longue période de temps ne peut donc être qu'optimiste. La thérapie génique va vraisemblablement se mettre en place petit à petit et les techniques employées vont continuer d'évoluer.

Il me semble également important de bien noter qu'au fil des ans, les recherches de thérapie génique se sont intéressées à des pathologies de plus en plus diverses. En effet, la thérapie génique n'était envisagée initialement que dans le cas de maladies strictement héréditaires, alors que maintenant le transfert de gènes est aussi considéré comme un éventuel outil thérapeutique pour des maladies acquises. L'avis du Comité

National d'Ethique tient d'ailleurs très clairement compte de ce double aspect de la thérapie génique.

Dans le cas des maladies héréditaires monogéniques, l'approche thérapie génique apparaît particulièrement logique. Ce type de thérapie s'adresse ici en premier lieu aux maladies récessives dont la correction ne nécessite que l'addition d'un gène normal pour diriger la synthèse de la protéine manquante. Néanmoins, la possibilité par recombinaison homologue de remplacer un gène muté par sa version normale, n'exclut pas les maladies dominantes. La fréquence de survenue de recombinaison homologue est cependant encore trop faible pour pouvoir envisager actuellement son utilisation au niveau de l'ensemble d'un tissu. Dans le combat contre les maladies héréditaires, la thérapie génique constituera donc vraisemblablement une nouvelle arme que l'on peut qualifier de «positive» et qui viendra s'ajouter au conseil génétique, au diagnostic prénatal, aux traitements médicamenteux et à la transplantation. Il faut insister ici sur le fait que, à la différence de la transplantation qui permet seulement l'approche «correction», le transfert de gènes peut aussi permettre l'acquisition par les cellules génétiquement modifiées de propriétés nouvelles intéressantes sur le plan thérapeutique.

On en est donc venu à concevoir également le transfert de gènes comme un nouveau type d'outil pharmacologique pouvant être intégré à des stratégies de traitement de maladies acquises (cancers, maladies neurologiques, cardiovasculaires, infectieuses dont le SIDA...)

Par exemple dans le cas de maladies dégénératives du système nerveux, on peut envisager de modifier des fibroblastes pour leur faire sécréter le neuromédiateur adéquat et puis les greffer dans la zone adéquate du cerveau. Ces fibroblastes constituent alors des minipompes biologiques. Un autre exemple est très connu dans le domaine de la cancérologie : c'est l'essai clinique, entrepris par l'américain Rosenberg du NIH (National Institute of Health), consistant à transférer le gène TNF (Tumor Necrosis Factor) dans les lymphocytes tueurs TIL d'un patient cancéreux afin de les rendre plus agressifs vis-à-vis de la tumeur (voir plus loin). Notons qu'il ne s'agit plus ici d'une simple «correction» mais déjà d'une «amélioration» (de la fonction d'un tissu somatique, ici le système immunitaire).

Les considérations générales précédentes m'amènent à commenter sur le plan

éthique les perspectives de thérapie génique somatique et aussi la question de la thérapie génique germinale. Précisons d'abord que la thérapie génique somatique consiste à modifier génétiquement un tissu somatique et que dans ce cas les cellules germinales ne sont pas délibérément modifiées. La modification n'est donc pas héréditaire, pas transmise à la descendance. Des techniques de transfert de gènes ont été mises au point spécialement dans ce but. A l'opposé, la thérapie génique germinale consisterait à volontairement modifier les cellules germinales ou l'oeuf indifférencié et la modification serait alors transmise à la descendance.

Dans le cas de la thérapie génique somatique, il n'y a guère de problèmes éthiques particuliers. Comme toute nouvelle méthode thérapeutique, la thérapie génique somatique devra faire la preuve de son efficacité et elle devra être comparée aux traitements existants, notamment à la transplantation. En effet, la transplantation peut être considérée comme une sorte de «thérapie génique globale» puisqu'elle aboutit à la greffe d'un tissu génétiquement normal. Cependant, la transplantation nécessite le recours à un donneur et elle expose le receveur aux problèmes immunologiques de toute greffe. La thérapie génique constitue une autogreffe génétique et n'aurait pas ces inconvénients. Notons cependant qu'une thérapie génique pourrait éventuellement nécessiter également un traitement immunosuppresseur dans les cas où le déficit génétique à corriger est total. La thérapie génique somatique pose donc les questions éthiques habituelles pour toute innovation thérapeutique (rapport efficacité/toxicité, consentement...). Une situation particulière est celle où il n'y a pas d'alternative thérapeutique : il y a alors une forte pression en faveur de la nouvelle possibilité thérapeutique. L'absence d'autre traitement radical peut être liée au manque de greffons pour la transplantation, voire la greffe peut être impossible comme dans le cas des myopathies. Il se peut aussi que la physiopathologie de la maladie soit encore inconnue et que seule l'anomalie génétique soit connue grâce aux techniques moléculaires de la génétique inverse. Dans toutes ces situations, il est alors crucial sur le plan éthique de définir les critères minimaux auxquels la thérapie génique doit satisfaire avant d'autoriser un essai clinique. Par exemple, lors de l'emploi d'un vecteur injecté dans la circulation sanguine du patient, il pourrait y avoir une modification accidentelle de certaines cellules germinales.

Bien que ne posant pas de problèmes éthiques particuliers, la thérapie génique somatique a cependant une caractéristique spéciale : il s'agit d'un nouveau type de traitement. En ce sens, l'américain French Anderson a pu écrire, à propos des

premiers essais cliniques, qu'il s'agit d'un «cultural breakthrough» (percée culturelle) . En effet, les recherches sur le transfert de gènes pourraient aboutir à la mise au point d'une méthode sûre et efficace pour modifier non seulement un tissu somatique mais aussi les cellules germinales. Ce point a été beaucoup discuté. On admet généralement que ce risque lointain ne doit pas faire stopper des recherches dont beaucoup de malades pourraient bénéficier.

J'aimerais à présent faire quelques remarques sur la génétique germinale. Il semble bon que la réflexion éthique précède ici la réelle possibilité scientifique. Néanmoins, commençons par quelques remarques scientifiques. Nous savons tous que l'homme est un organisme extrêmement complexe, qui est le résultat d'une très longue évolution. Les critères du transfert de gènes ne pourraient donc être que fantastiquement drastiques afin d'éviter des effets néfastes éventuels. Cependant, si l'on note qu'une modification génétique au niveau de l'oeuf indifférencié serait acceptée par le système immunitaire comme faisant partie du soi, le génie génétique atteint ici pleinement sa spécificité. Et aussi ses dangers. Les risques évidents d'un nouvel eugénisme invitent ici à la plus extrême prudence éthique. Quelle serait d'ailleurs l'utilité d'une telle entreprise ? La correction d'une anomalie génétique au niveau de l'oeuf n'a guère de sens, comme l'a souligné Axel Kahn ; la correction au niveau des gamètes en aurait sans doute plus. Surtout, certains chercheurs voient ici la possibilité unique d'une amélioration de la condition génétique de l'Homme, même s'il ne s'agit que de l'amélioration de certains caractères physiques simples. Il est évident que la réflexion éthique joue ici un rôle primordial. Avec son rôle consultatif pour le législateur, le Comité National d'Ethique dit très clairement dans son avis *«qu'il convient d'interdire formellement toute tentative de modification délibérée du génome des cellules germinales»*. L'extrême importance de cette question éthique n'a évidemment pas échappé au Mouvement Universel de la Responsabilité Scientifique (MURS), qui nous réunit ici et dont le but est justement de réfléchir au «devenir de l'homme face au progrès de la Science». Jean Dausset écrit en effet : *«L'homme ne doit plus subir son sort car il peut désormais orienter sa destinée vers un avenir réfléchi»*. Ainsi, le MURS propose à l'Organisation des Nations-Unies de se prononcer solennellement sur la proposition suivante : *«Le patrimoine génétique de l'homme, dans l'état actuel de nos connaissances, ne doit pas être modifié de façon héréditaire»*.

Cette réflexion éthique sur la thérapie génique germinale a évidemment aussi

lieu au niveau international. Des sensibilités différentes se sont ainsi fait jour. En novembre 90, le congrès de génétique de Valence (Espagne) adoptait la déclaration suivante : *«Germline gene therapy faces technical obstacles and does not command ethical consensus. We endorse further discussion of the technical, medical and social issues on this topic»*. Plus récemment, à Inuyama City au Japon, était adoptée la déclaration suivante : *«the modification of human germ cells for therapeutic or preventive purposes would be technically much more difficult than that of somatic cells and is not at present in prospect. Such therapy might, however, be the only means of treating certain conditions, so continued discussion of both its technical and its ethical aspects is essential»*. Le pédiatre américain Friedmann se demande : *«Ought we to consider enhancing some particularly useful traits ...?»* et conclut : *«We must keep our minds and imaginations open and receptive»*. Ce débat éthique me semble illustrer au plus haut point qu'il ne faut pas confondre l'acquisition des connaissances scientifiques et leur utilisation. C'est dans ce sens que le MURS suggère d'ajouter l'article suivant à la Déclaration Universelle des droits de l'homme : : *«Les connaissances scientifiques ne doivent être utilisées que pour servir la dignité, l'intégrité et le devenir de l'homme mais nul ne peut en entraver l'acquisition»*.

Les réflexions précédentes ont pour but de stimuler la réflexion éthique de chacun sur les effets à long terme des recherches entreprises. Cependant, les possibilités actuelles de la thérapie génique sont beaucoup plus limitées, comme l'illustrent les commentaires que je vais faire à présent au sujet des premiers essais cliniques de thérapie génique somatique autorisés par les instances américaines.

### ***Réflexions sur les premiers essais cliniques de thérapie génique somatique***

Connaître l'historique de la mise en route des premiers essais cliniques de thérapie génique somatique aux Etats-Unis permet de bien se rendre compte des réelles possibilités actuelles en ce domaine. L'historique de ces essais illustre d'ailleurs le fait habituel que toute nouvelle thérapie se met en place progressivement.

En 1986, l'investigateur américain French Anderson avait soumis un protocole de traitement de certains cas de déficit immunitaire congénital sévère liés à un déficit

en adénosine déaminase (ADA) par transfert du gène ADA humain dans les cellules de la moelle osseuse à l'aide d'un rétrovirus vecteur. Il s'agit de maladies très graves (les enfants «bulle») traitées actuellement par greffe de moelle osseuse. L'idée était de proposer éventuellement la thérapie génique à des patients qui n'avaient pas de donneur pour la greffe. Le protocole a donc été soumis à un comité national spécialisé du NIH, le "gene therapy subcommittee", comportant des scientifiques et de nombreux autres membres de diverses origines.

On peut noter que le souhait du Comité National d'Ethique français d'être consulté pour tout essai clinique de thérapie génique traduit la même volonté d'un contrôle sérieux des premiers essais en France. Cependant, on peut aussi souhaiter que le Comité National français, qui a à discuter de problèmes très divers, s'appuie sur une structure plus spécifique ; en effet, le comité de thérapie génique américain est en réalité un sous-comité du RAC, le Recombinant DNA Advisory Committee, qui s'occupe de l'ensemble des questions soulevées par le génie génétique en général. Les séances du comité de thérapie génique sont d'ailleurs publiques et les minutes de ces séances sont publiées, ce qui n'est pas un luxe étant donné la sensibilité de l'opinion publique pour ce sujet. French Anderson se proposait donc de prélever la moelle osseuse du malade, d'y introduire le gène ADA à l'aide d'un rétrovirus vecteur au laboratoire et puis de réinjecter la moelle génétiquement corrigée. En effet, principalement sous l'impulsion du scientifique américain Richard Mulligan, une technique avait été mise au point permettant d'obtenir des rétrovirus vecteurs (donc transportant le gène d'intérêt) capables d'infecter une seule et unique fois. Si l'étape d'infection se fait *ex vivo*, le gène d'intérêt n'est alors introduit que dans les cellules de la moelle osseuse et il n'y a notamment pas de modification des cellules germinales. Le transfert de gènes reste ainsi strictement somatique, limité au tissu hématopoïétique. Cependant, à l'époque où French Anderson avait soumis le premier protocole, on n'était pas encore capable, au laboratoire, de transférer efficacement un gène dans la moelle osseuse chez l'animal et ceci même chez la souris. La proposition de French Anderson avait donc été unanimement repoussée. Elle avait néanmoins eu le mérite de mettre en route un réel processus d'évaluation des protocoles de thérapie génique, qui s'est ensuite perfectionné au fil des ans et qui a joué un rôle majeur dans les débuts de la thérapie génique.

Ultérieurement, French Anderson, en collaboration avec le cancérologue Steven Rosenberg, s'est alors tourné vers l'emploi du transfert de gènes dans une



toute autre situation clinique. Rosenberg avait en cours, au NIH, un essai d'immunothérapie adoptive dans le traitement de mélanomes métastatiques : des lymphocytes infiltrant ces tumeurs, appelés TIL (Tumor Infiltrating Lymphocytes) sont obtenus, puis cultivés *in vitro* afin d'en obtenir un grand nombre et enfin réinjectés aux malades pour qu'ils retournent aux sites tumoraux et y combattent les cellules cancéreuses. La compréhension de cette thérapeutique était loin d'être parfaite, notamment en ce qui concerne le devenir à long terme des cellules TIL réinjectées. Or, les rétrovirus vecteurs sont capables d'intégrer le gène qu'ils transportent au niveau du génome des cellules qu'ils infectent, où ce gène va alors persister de façon stable. Anderson et Rosenberg se sont donc proposés de transférer *in vitro* le gène bactérien Néo dans les TIL dans le but de les marquer. Ils ont alors reçu l'autorisation d'effectuer l'essai clinique. Il faut bien se rendre compte qu'il s'agissait d'un essai de transfert de gènes plutôt que d'une réelle thérapie génique, le gène Néo transféré servant simplement de marqueur et son fonctionnement n'étant pas requis. Cet essai clinique a cependant permis de tester l'emploi des rétrovirus vecteurs, notamment en ce qui concerne les aspects de sécurité. Les rétrovirus vecteurs particuliers, utilisés pour cet essai clinique, avaient d'ailleurs dû être approuvés par la Food and Drug Administration. Le comité de thérapie génique avait aussi examiné avec grand soin certains points comme la méthode de sélection des patients, la confidentialité, la non-exclusion de l'essai d'immunothérapie en cas de refus de participer à l'essai transfert de gènes... On a ainsi pu montrer que des lymphocytes TIL pouvaient être détectés au niveau de la tumeur plusieurs semaines après leur réinjection. Surtout, on n'a pas noté de complications à court terme liées à l'emploi de rétrovirus vecteurs.

Les résultats de l'essai précédent ont alors poussé les mêmes investigateurs à proposer de nouveaux protocoles de transfert de gènes toujours dans les lymphocytes mais à présent dans un but vraiment thérapeutique. C'est ainsi que le 14 septembre 1990 une petite fille de 4 ans, atteinte d'un déficit en ADA et déjà sous traitement enzymatique a été traitée en plus par insertion du gène ADA humain dans ses propres lymphocytes T. A cause de la durée de vie limitée des lymphocytes, le procédé doit d'ailleurs être répété régulièrement. Depuis, un second enfant atteint d'un déficit en ADA a été traité de la même façon. L'évolution semble favorable mais seul le recul permettra de juger de la réelle utilité clinique du procédé, comme l'écrit d'ailleurs Anderson : *«Only time will tell if September 14 was an important first step or a false start in the history of gene therapy»*. Un autre essai clinique a également été

débuté par Rosenberg. Il s'agit du transfert du gène TNF (Tumor Necrosis Factor) dans les lymphocytes TIL dans l'espoir d'augmenter leur toxicité vis-à-vis des cellules cancéreuses.

Tout récemment, un essai de transfert de gènes dans les cellules du foie, les hépatocytes, a également été autorisé. Wilson, de l'Université du Michigan, se propose de transférer le gène du récepteur LDL (Low Density Lipoproteins) dans les hépatocytes d'enfants atteints de formes très graves d'hypercholestérolémie familiale. Cette maladie due à un défaut du gène du récepteur LDL se traduit par des complications cardiovasculaires gravissimes à un très jeune âge. La stratégie proposée par Wilson repose, comme pour les autres essais, sur un ciblage du transfert de gènes par une étape *ex vivo* : un fragment de foie est prélevé, les hépatocytes sont mis en culture et le gène du récepteur LDL y est introduit à l'aide d'un rétrovirus vecteur et enfin les hépatocytes sont réinjectés dans la circulation porte. Le transfert de gènes *ex vivo* permet ici encore une thérapie génique strictement somatique. L'essai clinique proposé par Wilson a l'avantage de reposer sur une expérimentation animale rigoureuse. Il existe en effet un modèle animal de la maladie humaine chez le lapin Watanabe. Chez ces lapins, Wilson et ses collaborateurs ont pu démontrer une importante diminution du taux de cholestérol sanguin stable à long terme après transfert du gène. En France, poursuivant une démarche différente de celle de Wilson, le groupe d'Olivier Danos et de Jean-Michel Heard à l'Institut Pasteur travaille sur un ciblage *in vivo* : le foie est chirurgicalement isolé de la circulation et puis transitoirement perfusé par un liquide contenant les virus vecteurs. Toujours en France, Michel Perricaudet et Pascale Briand ont réussi à obtenir des résultats très intéressants dans un modèle murin de déficit en ornithine transcarbamylase (OTC). Ces chercheurs n'ont pas utilisé de rétrovirus mais des adénovirus comme vecteurs. De plus, les adénovirus vecteurs ont été injectés directement dans la circulation sanguine. Des données très récentes suggèrent d'ailleurs que les adénovirus pourraient aussi constituer des vecteurs efficaces pour divers autres tissus, comme le muscle ou le poumon. Il se pose néanmoins ici le problème du ciblage *in vivo* d'un vecteur injecté dans la circulation sanguine, problème auquel s'est attaché Piechaczyk de Montpellier. Si un adénovirus vecteur est utilisé en spray au niveau du poumon, il se pose aussi la question de la propagation de ce vecteur depuis le malade à des personnes de son entourage lors des fréquentes infections spontanées par un adénovirus sauvage. Ces considérations mettent en évidence que si en France nous

proposons d'utiliser des adénovirus vecteurs, donc un type de vecteurs différent des rétrovirus employés aux USA, un cahier des charges particulièrement soigneux devrait être établi pour leur emploi.

En ce qui concerne le tissu hématopoïétique, les recherches ont progressé et divers investigateurs estiment à présent que le moment de proposer un essai clinique de transfert d'un gène thérapeutique dans les vraies cellules cibles, les cellules souches hématopoïétiques, n'est plus très éloigné. En effet, chez la souris, des expressions durables et relativement fortes de divers gènes d'intérêt ont été obtenues à long terme après greffe de la moelle manipulée (notamment pour les gènes ADA et glucocérobroside GC). Des résultats positifs quoiqu'encore très incomplets commencent même à être obtenus chez de grands animaux comme les singes. Surtout, la connaissance des caractéristiques et des propriétés fonctionnelles des cellules souches a beaucoup progressé. Ceci devrait faciliter leur manipulation, alors que jusqu'à présent les lymphocytes leur avaient été préféré en raison de leur plus grande facilité à être manipulés. D'ailleurs, des investigateurs de Memphis aux USA ont déjà proposé un protocole de marquage des cellules médullaires (toujours par le gène Néo) dans le but d'étudier la dynamique de la reconstitution hématologique après greffe et aussi le mécanisme de la rechute dans le cadre d'autogreffes pour neuroblastome ou pour leucémie myéloïde aiguë chez l'enfant.

## ***Conclusions***

La thérapie génique est un sujet révolutionnaire. Il y a un véritable foisonnement des recherches dans ce domaine et quelques essais cliniques ont déjà débuté. Notre réflexion éthique devrait être particulièrement importante dans deux situations, l'une à court terme et l'autre à long terme. A court terme, il faut veiller à éviter un dérapage au niveau des applications cliniques de la thérapie génique somatique, dérapage qui pourrait être favorisé par la pression médiatique. En ce qui concerne le long terme, j'espère avoir convaincu chacun de l'importance du débat éthique à propos de la thérapie génique germinale.

Pierre LEHN

Université Paris V, Hôpital Saint-Louis